

PRÁCTICA – ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES. IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

El objetivo de esta práctica para el estudiante es familiarizarse con el estudio de marcadores genéticos, obtener algunos resultados genéticos sencillos y poder tener una visión crítica que sirva para desarrollar conclusiones para la conservación de especies amenazadas. Para ello, emplearemos los datos genéticos proporcionados por el profesor de una especie amenazada y realizaremos varios análisis guiados, así como una puesta en común.

Para esta práctica emplearemos los datos del trabajo realizado por Lazaro-Nogal *et al.* (2017) *Ecology and Evolution* (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ece3.2940>). Es un trabajo que ha empleado marcadores de tipo microsatélite (marcadores neutrales) con la especie *Cneorum tricoccon* en toda su distribución.

Especie de estudio: el *Cneorum tricoccon*.

La olivilla *Cneorum tricoccon* (Cneoraceae) es un arbusto relicto del terciario de hasta un metro de altura (Figura 1) y medio porte. Su distribución se desarrolla a lo largo del arco



Figura 1 – Individuo de *Cneorum tricoccon*

mediterráneo norte, desde las costas de Granada, Cataluña, el sur de Francia y el litoral este de Italia, así como en varias islas y archipiélagos (Baleares, Sicilia y Cerdeña). Habita el maquis costero mediterráneo (bosque mediterráneo arbustivo), altamente amenazado por la presión urbana y las acciones antrópicas en general, lo cual ha provocado su clasificación como vulnerable (VU) según la UICN a nivel global. En relación a su dinámica poblacional, su característica

más importante es su proceso de dispersión, dado que desarrolla unos frutos carnosos que pueden ser ingeridos por animales de pequeño y mediano tamaño. En las islas Baleares, se ha documentado la dispersión por medio de lagartos y lagartijas como *Podarcis lilfordi* o *P. pituyensis* (Figura 2) mientras que en las poblaciones continentales, al haber

desaparecido estos lagartos, su papel lo han sustituido mamíferos como la marta (*Martes martes*) o la comadreja (*Mustela nivalis*). El impacto de esta sustitución de los dispersores es aún desconocido en la dinámica poblacional. A su vez, debido a los impactos antropogénicos, algunas de las poblaciones se han visto alarmantemente reducidas, con un bajo número de individuos.



Figura 2 – *Podarcis lilfordi* mirando un apetecible fruto de *Cneorum tricocon*.

Antes de este estudio, se han realizado algunas aproximaciones a la genética del *Cneorum tricocon* con marcadores plastidiales. Los resultados (no publicados) demuestran que las poblaciones de Baleares y de Cataluña-Sur de Francia son las más diversas y posiblemente, uno de los puntos centrales en la distribución de la especie (Figura 3).

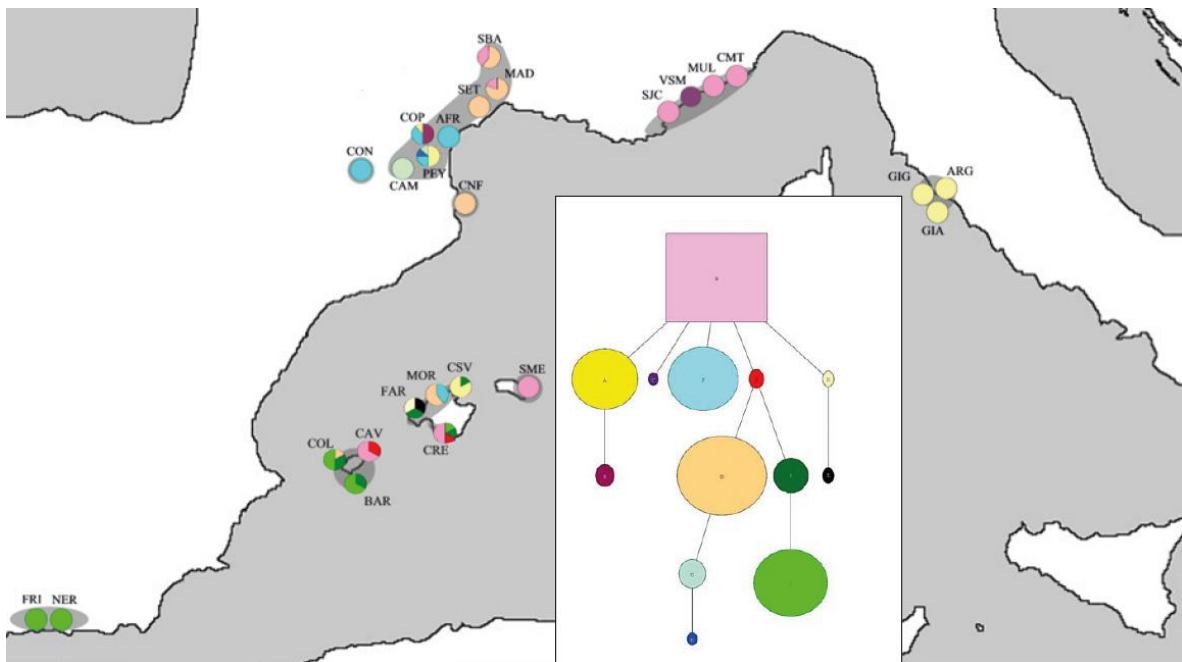


Figura 3 – Estudio con marcadores plastidiales de *Cneorum tricocon*.

Por ello, realizamos un trabajo con marcadores microsatélite, para poder evaluar con más resolución la diversidad genética, el flujo genético entre poblaciones y poder realizar algunas consideraciones y recomendaciones en su conservación.

Análisis de marcadores microsatélites: GenAIEx. Diversidad y diferenciación genética

GenAIEx (<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Welcome.html>) es un software basado en Excel (Peakall and Smouse 2006 Molecular Ecology Notes), con una serie de macros

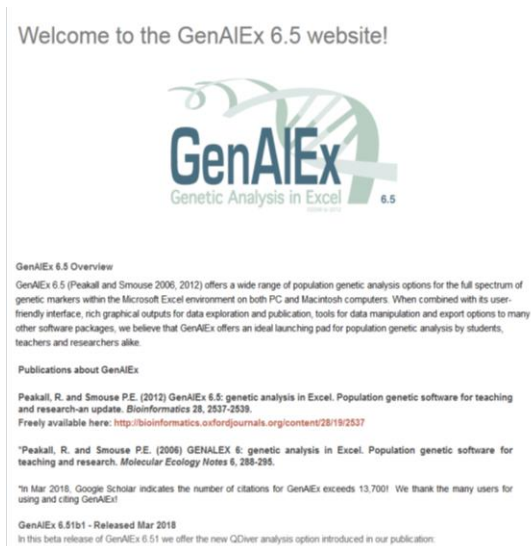


Figura 4 - GenAIEx

que permiten realizar los cálculos básicos de genética de poblaciones. Tiene algunas ventajas, como es la facilidad de uso y la capacidad de trabajar con varios formatos de datos (Figura 4). Emplearemos GenAIEx para realizar los cálculos básicos de diversidad genética, el aislamiento y la diferenciación como son la heterocigosidad observada y esperada (H_O y H_E), el número de alelos por población (N_a), el porcentaje de loci polimórficos (%P), los alelos privados, (alelos que están presentes en una única población,

A_{PRIV}) y el coeficiente de endogamia (F). También lo emplearemos para calcular los coeficientes de diferenciación entre pares de poblaciones (F_{ST}). Para ello, proporcionamos una tabla Excel que debes de rellenar con cada uno de los parámetros, que nos permite sintetizar la información a nivel poblacional y que tiene información sobre el tamaño de las poblaciones y el potencial dispersor de la especie.

Para ello, tenéis que usar la opción “Frequency” de GenAIEx, considerar que los microsatélites son marcadores codominantes (permiten diferenciar heterocigotos de homocigotos) y explorar tantas opciones como considereis para hacer los cálculos necesarios. Tener en cuenta que GenAIEx permite hacer multitud de aproximaciones (por locus, por población, por locus y población...), pero que solo necesitamos aquellas a nivel poblacional medio (podéis hacer las otras, pero no son necesarias). Los resultados aparecerán como hojas de Excel anexas (Resultados Cneorum A Rellenar) que teneis que explorar.

Pregunta 1 - ¿Qué conclusiones podemos sacar en relación a la diversidad genética de las poblaciones? ¿Coinciden los resultados con los obtenidos con los marcadores plastidiales (Figura 3)? ¿Podéis obtener algún tipo de conclusión con los parámetros biológicos dados (Dispersor o Tamaño poblacional)?

Pregunta 2 - ¿Qué consecuencias puede tener estos niveles de coeficiente de endogamia? ¿Coincide con los resultados de diversidad genética? ¿Podéis obtener algún tipo de conclusión con los parámetros biológicos dados (Dispersor o Tamaño poblacional)?

Pregunta 3 - ¿Qué resultados obtenemos a nivel de diferenciación genética? ¿Hay migración entre las diferentes poblaciones? ¿Coincide con otros parámetros de aislamiento, como los alelos privados? ¿Hay algún patrón de aislamiento por distancia?

** Bonus track – Con la opción de Shannon – Pairwise statistics se puede calcular el número de migrantes entre poblaciones (N_m). Calcularlo y evaluar si los valores son coincidentes con los obtenidos con el F_{ST} .*

Análisis de marcadores microsatélites: GenAlEx. Análisis de estructura genética (PCA y clustering).

GenAlEx permite realizar algunos análisis básicos de estructura genética. Entre ellos permite realizar un análisis de componentes principales (PCoA), que de carácter exploratorio, puede ser útil para obtener una primera aproximación de la estructura genética. Para ello, debéis de estar en la hoja de diferenciación o distancias genéticas (por ejemplo F_{ST} o Nei) y explorar la opción del PCoA que os despliega GenAlEx.

Pregunta 4 - ¿Qué conclusiones podemos obtener a partir del PCA? ¿Qué porcentaje de variabilidad explican los 2 ejes del PCA? Si se hace un PCA con el eje 3, ¿Cambian algunas conclusiones?

GenAlEx no puede realizar análisis de clusters. Para ello resulta necesario recurrir a otros tipos de software más concretos y dedicar un alto tiempo de computación (salvo que se disponga de un poder de computación avanzado. Por ello, proporcionamos las salidas de STRUCTURE (Figura 5), probablemente el análisis de clusters más usado. Para un buen cálculo de STRUCTURE, es necesario explorar todos los posibles escenarios posibles (K grupos o clusters) y compararlos entre sí. Los análisis muestran que $K=6$ es el resultado más plausible.

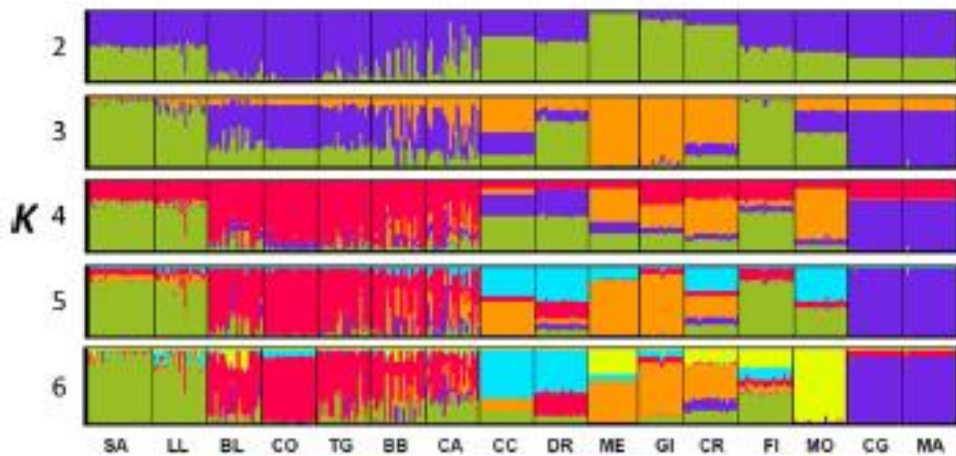


Figura 6 – Salidas de STRUCTURE, desde $K = 2$ a $K = 6$.

Pregunta 5 - ¿Qué conclusiones podemos sacar del análisis de estructura con la aproximación de clusters? ¿Es coincidente con los PCA y a qué nivel?

Análisis de marcadores microsatélites: NeEstimator, ejemplo de software para cálculo de tamaño poblacional efectivo.

Existen multitud de programas y aproximaciones para calcular los tamaños efectivos poblacionales. La mayor parte de estas aproximaciones están pensadas para animales y producción ganadera (pesquerías, rebaños, cabaña ganadera necesaria etc.). Además, suelen ser muy intensos a nivel computacional. Para esta práctica, vamos a utilizar la aproximación desarrollada por el programa de orientado a pesquerías Ne Estimator

software 2.1 (<http://www.molecularfisherieslaboratory.com.au/neestimator-software/>), el cual tiene una versión GUI (Graphical User Interface, Figura 7) muy intuitiva.

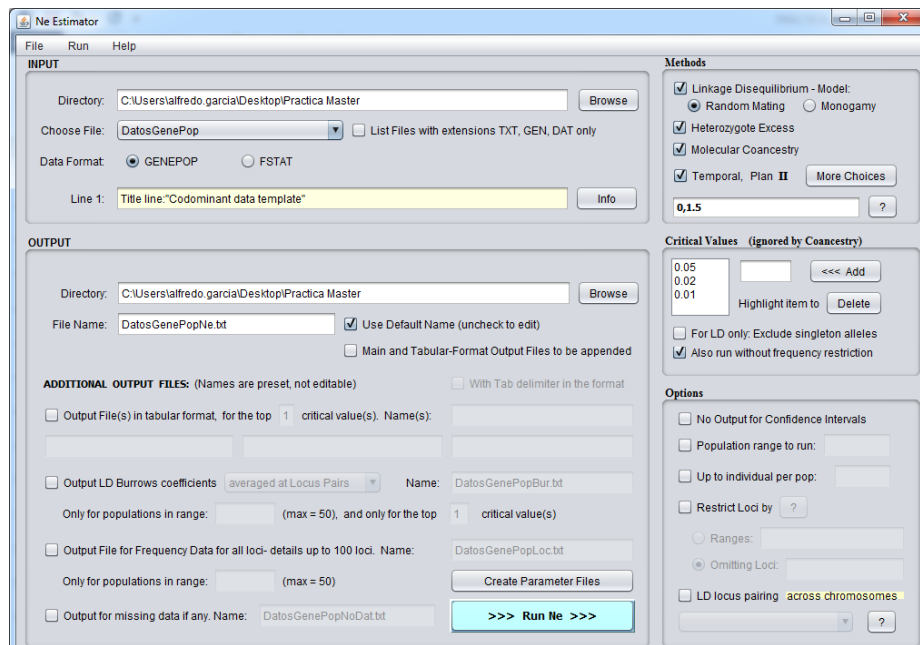


Figura 7 – GUI del Ne Estimator.

Para ello, ejecutar la opción NeEstimator2x1 autoejecutable (aplicación basada en Java, hay que tener la máquina de Java actualizada). El programa trabaja con los datos en formato GenPop, los cuales los tenéis en la carpeta de la práctica (DatosGenepopNeEstimator). El programa permite multitud de opciones y aproximaciones (se puede consultar en la web y en las referencias citadas). Para esta práctica, trabajaremos con las opciones por defecto. La salida generará un output en formato .txt con multitud de datos y aproximaciones. Vamos a tomar el algoritmo más sencillo (Linkage disequilibrium method, lowest allele frequency used) basado en genes asociados. Se pueden obtener resultados con varias frecuencias usadas. Es posible que algunas poblaciones no pueda calcularse (aparecerá como “Infinite”).

Pregunta 6 - ¿Qué poblaciones presentan un menor tamaño efectivo? ¿Concuerda con algún otro parámetro genético? ¿Cual presenta mayor diferencia con el número de individuos muestreados?

*Pregunta 7 - A raíz de los resultados obtenidos ¿Qué conclusiones podemos hacer en relación a la conservación del *Cneorum tricocon*? ¿Qué poblaciones presentan problemas genéticos graves (o más graves)? ¿Qué acciones promoverías para mejorar el estado de algunas poblaciones dentro de un plan de gestión de la especie?*